

Uusien ESPGHAN-kriteereiden käyttökelpoisuus riskiryhmien keliakiadiagnostiikassa

Jaakko Salminiemi
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö

Tammikuu 2014
Tiivistelmä artikkelista Utility of the new
ESPGHAN criteria for the diagnosis of celiac
disease in at-risk groups (J Pediatr
Gastroenterol Nutr 2012;54:387–91)

Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö

**SALMINIEMI JAAKKO: UUSIEN ESPGHAN-KRITEEREIDEN KÄYTTÖKELPOISUUS
RISKIRYHMIEN KELIAKIADIAGNOSTIIKASSA**

Kirjallinen työ,
Ohjaajat:
Kalle Kurppa, dosentti, lastentautien erikoislääkäri
Katri Kaukinen, professori, sisätautien ja gastroenterologian erikoislääkäri

Helmikuu 2014

Avainsanat: keliakia, kriteerit, diagnoosi, ESPGHAN

Keliakia on vehnässä, ohrassa ja rukiissa esiintyvän gluteenin aiheuttama krooninen autoimmuunisairaus, joka ohutsuolenlimakalvomuutosten lisäksi affisioi koko elimistöä. Tyypillisimmät oireet ovat ripuli, vatsakipu ja laaja-alainen imeytymishäiriö, mutta suuri osa potilaista on lieväoireisia tai oireettomia. Hoitona on elinikäinen täysin gluteeniton ruokavalio. Diagnoosin kulmakivenä on tähän asti ollut gastroskopiassa otettu ohutsuolibiopsia ja siinä todetut histopatologiset tyypimuutokset. Keliakian yleistymisen on lisännyt painetta kehittää uusia diagnoosimenetelmiä. Uudet transglutaminaasivasta-ainemäärityksiin perustuvat Eurooppalaisen pediatriksen gastroenterologia, -hepatologia ja -ravitseminen järjestön (ESPGHAN) luomat diagnoosikriteerit tuovat vaihtoehtoja keliakiadiagnostiikkaan tietyssä lapsipotilasryhmässä. Lähdimme testaamaan tutkimuksessamme ESPGHAN-kriteereiden toimivuutta laajemmassa potilasaineistossa, mitä varten ne oli alunperin luotu. Tulosten perusteella käytetty transglutaminaasivasta-ainetestit korreloi erinomaisesti muiden serologisten testien kanssa ja siinä saaduilla korkeilla arvoilla oli hyvä tarkkuus keliakiadiagnoosiin pääsemisessä. ESPGHAN-kriteereitä voitiin tulostemme pohjalta onnistuneesti soveltaa ensikertaa myös aikuisväestössä. Biopsiaton keliakiadiagnoosi on nyt askeleen lähenpänä kun sen rajoitukset ymmärretään ja sitä sovelletaan kliinisessä työssä oikein.

Tämä työ on tiivistelmä alkuperäisartikkelista, jossa toimin toisena kirjoittajana. Artikkelin julkaistiin Journal of pediatric gastroenterology and nutrition-lehdessä 3/2012. Osallistuin artikkelin suunnitteluun, kirjoittamiseen sekä siinä esiintyvien taulukoiden tekoon. Syventäviä opintoja varten perehdyin kattavasti keliakia-aiheiseen kirjallisuuteen ja kansainvälisiin julkaisuihin.

Sisällys

Johdanto.....	4
Tutkimusmenetelmät.....	8
Tulokset.....	9
Pohdinta.....	10
Lähteet.....	12

Johdanto

Keliakia on vehnässä, rukiissa ja ohrassa esiintyvän gluteenin aiheuttama krooninen autoimmuunisairaus, jonka puhkeaminen tarvitsee myös geneettisen alttiuden. Klassiset keliakian vatsaoireet kuten krooninen ripuli, vatsakivut sekä imeytymishäiriöt aiheutuvat ohutsuolen limakalvovauriosta, jossa krooninen inflammaatio aiheuttaa limakalvon lymfocytoosia, villusatrofiaa ja kryptahyperplasiaa. Ainoana tunnettuna hoitona on koko elämän aikainen gluteeniton dieetti, jota noudattamalla oireisto ja ohutsuolimuutokset paranevat.

Keliakian esiintyvyys on lisääntynyt länsimaissa viimeisten vuosikymmenten aikana. Suomessa diagnosoituja keliakikkoja on noin 1-2 % esiintyvyyden jatkuvasti kasvaessa. Tauti on yleisempi naisilla ja se voi puhjeta missä elämän vaiheessa tahansa (1). Keliakikon ensimmäisen asteen sukulaisella tai tyypin 1 diabeetikolla esiintyvyys on vielä korkeampi. Esiintyvyyden on katsottu tuplaantuneen kahdessa vuosikymmenessä (2,3). Vaikka tietoisuus keliakiasta ja sen diagnostiikka on kehittynyt tuossa ajassa, ei se itsenäisesti riitä selittämään esiintyvyyden kasvua. Keliakialle altistavat ympäristötekijät ovat edelleen epäselviä, mutta on esitetty, että useat lapsuusiän infektioaudit ja vehnän lisääntynyt kulutus olisivat näitä tekijöitä (4). Parantuneesta diagnostiikasta huolimatta suurin osa keliakikoista on edelleen diagnosoimatta (5).

Keliakiaan sairastuminen vaatii gluteenille altistumisen lisäksi geneettisen alttiuden. HLA-DQ2 ja –DQ8 alleelien esiintyminen on yhdistetty keliakiaan. Koska kyseiset alleelit ovat väestötasolla yleisiä, näiden esiintyminen ei tue diagnoosia vaan ne ovat käyttökelpoisempia keliakiaa poissuljettaessa. Mikäli alleeleja ei ole, on keliakia epätodennäköinen (6). Gluteenin proteiineista gliadiini reagoi keliakikon elimistön CD4-auttaja-T-solujen kanssa aikaansaaden inflammatorisen reaktion ohutsuolen limakalvolla. Tämä aikaansaa lopulta keliakialle tyypilliset ohutsuolen muutokset: villusatrofia, epiteelin lymfocytoosi sekä kryptahyperplasia (7). Ohutsuolimuutokset voivat olla hyvin eritasoisia ja ne lajitellaan histologisen ilmiönsä perusteella Marshin asteikolla 0-4, jossa 0 tarkoittaa normaalia histologiaa ja 4 voimakkainpia ohutsuolimuutoksia.

Keliakian kliininen taudinkuva vaihtelee täysin oireettomasta hyvin voimakkaasti oireileviin. Keliakian tyypilliset suolisto-oireet ovat ripuli, turvotus, ilmavaivat, vatsakipu, imeytymishäiriöt ja

suolen epäsäännöllinen toiminta. Nämä ovat edelleen koko oirekirjosta ne yleisimmät oireet, vaikka ymmärrys keliakian taudinkuvasta viime vuosikymmeninä on kasvanut ja klassisten suolisto-oireiden lisäksi on tunnistettu lukuisia suoliston ulkopuoleisia oireita. Näitä ovat väsymys, kutiseva ihottuma, kohonneet maksa-arvot, verenkuvan muutokset, raudanpuuteanemia, nivelkivut, luun mineraalitiheyden alenema, hammaskiilteen vauriot, aflat, erilaiset neurologiset ja psykiatriset oireet, lapsilla heikentynyt kasvu ja naisilla infertiliteetti sekä keskenmenot (8). Usein keliakikkojen oirekuva on lievä tai he eivät oirehdi lainkaan (9). Kliinisesti oirekuva ei eroa kovin merkittävästi lasten ja aikuisten välillä. Ihokeliakia on keliakian tyypillisin suoliston ulkopuoleinen manifestaatio. Siinä kehittyy kutiavaa, rakkulaista ihottumaa vartalon ekstensoripinnoille: kyynärpäihin, polviin ja pakaroihin. Suolisto-oireet ovat lievät, mutta ihokeliakikoilla on kuitenkin tyypillinen ohutsuolenlimakalvovaurio. Sekä iho- että ohutsuolimanifestaatiot paranevat gluteenittomalla ruokavaliolla kuten tavallisessa keliakiassakin (10). Keliakian yhteydessä esiintyy usein myös toisia autoimmuunisairauksia kuten sjögrenin syndroomaa, astmaa, IgA-nefropatiaa, systeemistä lupus erytematoosusta, addisonin tautia, kilpirauhasen autoimmuunisairauksia, autoimmuunihepatiittia ja tyypin I diabetesta (8). Vastaavasti muiden autoimmuunisairauksien esiintyminen nostaa keliakian riskiä moninkertaiseksi. Myös moninaisia psykiatrisia ja neurologisia oireita on yhdistetty keliakiaan (11) ja erityisesti oireinen keliakia saattaa provosoida psykiatrista oirehdintaa (12).

Keliakian diagnoosi lähtee epäilyksen heräämisestä, mikä jo sekin voi olla haastavaa moninaisen oirekuvan vuoksi. Hyvin koulutettu lääkärikunta löytää yhä useamman aiemmin diagnosoimattoman tapauksen osaamalla epäilemällä sitä (13). Diagnoosi perustuu keliakiavasta-ainetasojen mittaamiseen ja tämän jälkeen suoritettuun ohutsuolibiopsiaan, jossa keliakialle tyypillisen histopatologian esiintyminen vahvistaa diagnoosin. Lievimmissä limakalvomuutoksissa (Marsh I) lymfosyyttien infiltraatio suolen limakalvolle ei ole keliakiaspesifinen löydös vaan sitä esiintyy myös muissa suolen tulehdustiloissa kuten crohnin taudissa, helikobakteeri-infektiossa ja ruoka-allergiassa. Tässä tilanteessa keliakiavasta-aineet auttavat erotusdiagnostiikassa. Biopsia ei kuitenkaan ole ongelmaton: se on kallis ja potilaalle raskas tutkimus. Näytteet eivät ole aina teknisesti onnistuneita ja niiden laatu vaihtelee usein (14).

Keliakiavasta-aineet ovat kätevä ensivaiheen tutkimus kun epäily mahdollisesta keliakiasta herää. Seerumista määritetään IgA-luokan endomysium- tai/ ja kudostransglutaminaasivasta-aineet. Näiden testien herkkyys on 85-100% ja tarkkuus lähes 100% keliakian diagnosoinnissa (15,16). Kuitenkin seerumista olisi myös hyvä tarkistaa kokonais-IgA ja mikäli tämän puute havaitaan niin tällöin IgG-

luokan keliakiavasta-aineet ovat käyttökelpoisia (17). Endomysiumvasta-aineiden määrittäminen perustuu epäsuoraan immunofluoresenssitekniikkaan, joka on laboratorioille työläämpi kuin entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä (ELISA) tehtävä kudostransglutaminaasivasta-ainemäärittäminen. Vaikka testit ovat tarkkoja, ne eivät ole standardoituja keskenään ja eri laboratorioiden välillä voi esiintyä vaihtelua (18). Negatiivinen tulos ei kuitenkaan poissulje keliakiaa mikäli kyseessä on vahva kliininen epäily; tällöin ohutsuolibiopsia on ainoa vaihtoehto (19). On myös kehitetty transglutaminaasivasta-aineita tunnistava pikatesti, mikä tuo nopean seulontakeinon vastaanottotilanteeseen ja potilaan kotiin. Testi vastaa suorituskäytännön seerumista tehtäviä määrittämiä.

Keliakialle altistavia HLA-DQ2 ja -DQ8-alleelit voidaan määrittää silloin kun ohutsuolen biopsialöydös on epäselvä rajatapaus. Myös korkean riskin henkilöillä, kuten keliakikon ensimmäisen asteen sukulaisilla tai tyypin I diabeetikoilla, keliakian todennäköisyys on erittäin pieni jos tulos on negatiivinen. Positiivinen tulos ei kuitenkaan tue diagnoosia, koska kyseisten alleelien esiintyvyys väestössä, ja samalla myös riskiryhmissä, on yleistä (20).

Useissa tutkimuksissa on kuitenkin alettu kyseenalaistamaan vain biopsiaan pohjautuvaa keliakiadiagnostiikkaa (21-24) sen rajoitteiden takia. Vuonna 2012 ESPGHAN julkaisi uudet diagnostiset kriteerit, joiden mukaan korkeat seerumin transglutaminaasivasta-ainepitoisuudet riittävät keliakiadiagnoosiin, mikäli potilaalla on taudille tyypillisiä oireita. Riskiryhmässä oleville, mutta oireettomille potilaille, biopsia on diagnoosiin pääsemiseksi edelleen välttämätön. Suositus laadittiin koskemaan vain lapsipotilaita (25). Korkeiden vasta-ainepitoisuuksien yhteyttä biopsialla varmennettuun keliakiadiagnoosiin on tutkittu ja näissä tutkimuksissa tulokset ovat olleet lupaavia (21,23,26,27). Kuitenkin on tutkimuksia, joissa vastakkaisia tuloksia on saatu (22,28). Tämä johtuu siitä, että positiiviseksi tulokseksi tulkittiin eri raja-arvoilla olevia vasta-ainepitoisuuksia ja potilasjoukot, joita tutkittiin olivat hyvin heterogeenistä, eri kriteereillä valittuja. Lisätutkimuksia tarvitaan asiasta vielä kattavasti: riittävän tarkat ja herkäät vasta-ainetasoraja-arvot tulee määrittää ja niitä tulee testata erilaisissa potilasjoukoissa. Myös transglutaminaasivasta-ainemääritykselle olisi hyvä luoda kansainväliset standardit, jotta mahdollinen virhe laboratorion puolelta saataisiin minimoitua. Kuitenkin matka kohti biopsiatonta keliakiadiagnoosia on jo hyvässä vauhdissa.

Ainoa keliakian hoitovaihtoehto tällä hetkellä on elinikäinen gluteeniton ruokavalio. Tällöin tulee välttää vehnää, ruista ja ohraa, mutta kaura ruokavaliossa vaikuttaa turvalliselta pitkälläkin aikavälillä (29). Kuitenkin osalla potilaista kaura saattaa aiheuttaa ohutsuolenlimakalvon vaurioita

(30). Kauratuotteita käytettäessä tulee myös varmistua, että tuotteet eivät sisällä jäämiä muista viljoista. Teollisesti valmistetut gluteenittomat vehnätuotteet sopivat keliakikoille. Ruokavalion tarkoituksena paitsi poistaa potilasta vaivaavat oireet niin myös ehkäistä hoitamattoman keliakian mahdollisia komplikaatioita: anemiaa, osteoporoosia, muita ravintoainepuuttiloja ja ohutsuolen syöpiä (31,32,33,34). Hyvässä hoitotasapainossa oleva keliakikko ei tarvitse lisäravinteita, mutta huonossa hoitotasapainossa oleva saattaa kärsiä raudan, folaatin, sinkin, magnesiumin B12- ja D-vitamiinien puutteesta, jolloin lisäravinteet tulevat tarpeeseen (35). Tilanne tulee kontrolloida ja varmistua, että hivenainetasot ovat normalisoituneet. Vaikka keliakian hoito kuulostaa helpolta ja gluteenistä pidättäytyminen korjaa hyvin potilaan oireet, niin monilla potilailla on vaikeuksia sitoutua hoitoon, koska ruokavalio koetaan hankalaksi ja rajoittavaksi (19). Etenkin oireettomilla tai vähäoireisilla potilailla on enemmän hankaluuksia sitoutua hoitoon kuin oireisilla. Hoitomyöntyvyyttä edistää hyvä potilas-lääkärisuhde ja useammat käynnit vastaanotolla (36).

Vaadittavaa tiukkaa diettiä on vaikea noudattaa, joten on herännyt tarve kehittää diettiä tukevia hoitoja. Aihetta tutkitaan aktiivisesti, mutta vielä markkinoilla ei ole keliakian hoitamiseen tarkoitettua lääkehoitoa.

Tässä tutkimuksessa on tarkoitus testata ESPGHANin määrittelemiä keliakian uusien diagnostisten kriteereiden toimivuutta potilasjoukossa, jossa olevat aikuiset ja lapset kuuluvat riskiryhmään keliakian suhteen. Tämä tutkimuspopulaatio poikkeaa alkuperäisestä ryhmästä, jota varten kriteerit luotiin. Arvioimme myös millä transglutaminaasivasta-ainetasoilla saadaan riittävä herkkyys ja tarkkuus, nyt ESPGHAN määrittää diagnoosiin oikeuttavat transglutaminaasivasta-ainetasot kymmenkertaisiksi normaalin ylimpiin arvoihin verrattuna. Samalla on tarkoitus vertailla eri serologisten testien suorituskkyä toisiinsa verrattuna.

Tutkimusmenetelmät

Tutkimuksen aineisto kerättiin valtakunnallisesti rekrytoimalla mainoksia ja paikallisia potilasyhdistyksiä hyväksikäyttäen yhteensä 730 aiemmin diagnosoitua keliakiapotilasta. Tämän jälkeen heidän ensimmäisen tai toisen asteen sukulaisia, joita oli yhteensä 3031, kutsuttiin tutkimuksiin ja heistä tutkittiin seerumin keliakiavasta-aineita sekä vasta-ainepositiivisilta myös keliakialle altistavien HLA-DQ2 ja –DQ8 alleelien mahdollinen olemassaolo. Poissulkukriteereinä oli aiemmin todettu keliakia tai ihokeliakia tai gluteeniton ruokavalio muusta syystä. Yhteensä tutkimuksesta poissuljettuja tapauksia oli 394.

Serologisina testeinä kaikilta otettiin IgA-luokan transglutaminaasivasta-ainetasot (RBC-TG2ab) sekä IgA-luokan endomysium vastainaineet (EmA). Kaikkista positiivisista tuloksista otettiin vielä toisen valmistajan IgA-luokan transglutaminaasivasta-aineet (Hr-TG2ab). Testit suoritettiin valmistajien ohjeiden mukaan.

Gastroskopiaa tarjottiin, mikäli serologisissa testeissä havaittiin kohtalainen tai suuri RBC-TG2ab-tasojen nousu, kaikille EmA- sekä Hr-TG2ab-positiivisille. Vähän kohonneille RBC-TG2ab-tasoille suositeltiin gastroskopiaa mikäli keliakialle tyypillisiä oireita esiintyi. Gastroskopiat ja mahdolliset keliakiadiagnoosit tehtiin paikallisesti kansallisen standardin mukaisesti.

Tilastollinen data esitettiin henkilöiden lukumääränä ja prosentteina tai mediaaneina ja vaihteluväleinä.

ESPGHAN kriteereiden käyttökelpoisuutta arvioitiin jakamalla tutkittavat eri ryhmiin transglutaminaasiarvojen perusteella ja heille tarjottiin gastroskopiatutkimusmahdollisuutta diagnoosin varmistamiseksi nykykriteereiden mukaan.

Tulokset

3031 henkilöä ilman aiempaa keliakiadiagnoosia osallistui serologisiin kokeisiin, näistä 25% oli alle 18-vuotiaita. 77% koehenkilöistä oli ensimmäisen asteen sukulaisia, heiltä keliakia diagnosoitiin huomattavasti useammin kuin kaukaisemmilta toisen asteen sukulaisilta.

Korkeat RBC-TG2ab-arvot (>100 U) korreloivat hyvin EmA- ja Hr-TG2ab-positiivisuuksiin. Lisäksi keliakiaan yhdistetyt HLA-DQ2, -DQ8 tai puoli-DQ2 alleelit löydettiin kaikilta tutkituilta. Gastroskopoituilta henkilöiltä, joilta mitattiin lisäksi korkeat RBC-TG2ab- arvot, keliakia diagnosoitiin 94%:lta (94% lapsia ja 94% aikuisia). Tästä ryhmästä 91% suostui gastroskopiaan.

Yhteys positiivisiin Hr-TG2ab- ja EmA-arvoihin kohtalaisesti kohonneilla RBC-TG2ab-arvoilla (30-99 U) oli huono. Merkittäväällä osalla tästä joukosta ei myöskään ollut keliakiaan yhdistettyjä HLA-alleeleja. Biopsiaan suostui tästä joukosta 64% ja keliakia diagnosoitiin biopsialla 35%:sta lapsista ja 74%:sta aikuisista.

Suurimmalla osalla henkilöistä, joilla oli heikko positiivinen RBC-TG2ab-arvo (20-29 U) oli myös negatiivinen Hr-TG2ab- ja EmA-arvo. Keliakiaan yhdistettyjä HLA-alleeleja puuttui 16%:lla testatuista. Viidestä kliinisesti oireilevista potilaista neljällä diagnosoitiin keliakia biopsiasta.

Pohdinta

Nykyinen biopsiaan perustuva keliakiadiagnostiikka ei ole ongelmaton ja sitä tulisikin jatkossa tarkastella kriittisesti ja tarvittaessa uudistaa. Gastroskopiat ovat kalliita ja hankalia, erityisesti yleisanestesian vaativien lasten kohdalla. Histologisen näytteen laatu ja sen tulkinta tuo virhemahdollisuuksia jopa enemmän mitä aiemmin oltiin oletettu (1,14). Uudet ESPGHAN-kriteerit painottavat transglutaminaasivasta-arvoja diagnostiikassa. Nämä on todettu tarkoiksi ja niitä on kätevä mitata ELISA-tutkimusmenetelmällä. Kvantitatiivisen tutkimuksen diagnostisen tarkkuuden ajatellaan paranevan kun vasta riittävän korkeat raja-arvot (2.4-13.6 kertaiset normaaliin verrattavat raja-arvot) tulkitaan positiiviseksi löydökseksi ja tämän on ajateltu korvaavan nykyisen gastroskopiatutkimuksen (25).

Tutkimuksessa RBC-TG2ab-testin voimakkaasti positiiviset arvot ($> 100\text{U}$) katsottiin täyttävän ESPGHAN- kriteereiden asettaman positiivisen transglutaminaasivasta-ainetasojen määritelmän. Tulokset tukivat näitä kriteerejä, voimakkaan positiiviset RBC-TG2ab-testin arvot osoittivat hyvää tarkuutta keliakian diagnoosissa tässä tutkimuspopulaatiossa. Kriteereitä pystyttiin soveltamaan hyvin heterogeeniseen populaatioon. Positiivinen ennustearvo ei ollut 100%, mutta voimakkaan positiivinen RBC-TG2ab korreloi hyvin EmA, Hr-TG2ab ja keliakiaan yhdistettyjen HLA-alleelien positiivisuuksiin, minkä takia väärä positiivinen tulos on epätodennäköinen. Positiivinen ennustearvo ei korreloi täysin positiiviseen biopsialöydökseen, mikä johtuu ei vain teknisestä näytteen tulkinnan vaikeudesta vaan myös siitä, että ohutsuolen limakalvovaurion syntyminen on asteittainen prosessi. On osoitettu, että EmA positiivisuus ennustaa suurella todennäköisyydellä ohutsuolivaurioiden kehittymistä keliakiapotilailla, joilla tätä ei vielä ole (37-40) ja että he hyötyvät gluteenittomasta ruokavaliosta jo tässä vaiheessa (39,40).

Aikaisemmassa tutkimuksessa havaittiin, että tämän tutkimuksen vastaavaa raja-arvoa ja RBC-TG2-ab-testiä käytettäessä tarkuus oli 100% (26). Muissa tutkimuksissa eri serologisia testejä käytettäessä tulokset eivät ole olleet täysin linjassa (21, 22, 28). Ikä, histologiset menetelmät ja sairauden ennakkotodennäisyys saattoivat vaikuttaa tuloksiin. Kuitenkin korkeat transglutaminaasivasta-ainetasot yhdistettynä positiivisiin keliakia HLA-alleelien olemassaoloon luovat olosuhteet, joissa väärin positiivisten tulosten esiintyminen on erittäin epätodennäköistä.

Kohtalaisesti tai vähän kohonneet RBC-TG2ab-arvot viittaavat huonosti positiivisiin biopsialöydöksiin ja tätä seuraavaan keliakiadiagnoosiin. Muiden tutkimusten tulokset ovat ristiriitaisia alempia raja-arvoja käytettäessä (22, 27). Keliakiaa epäiltäessä tässä potilasjoukossa on histologinen tutkimus edelleen välttämätön oikeaan diagnoosiin pääsemiseksi.

Tutkimuksellamme oli myös rajoituksensa. Gastroskoppioita ei tehty samassa keskuksessa tai kaikille seropositiivisille henkilöille. Lisäksi kaikille oli mahdotonta suorittaa gastroskopiaa, jotta olisimme päässeet arvioimaan kaikkien serologisten testien herkkyyttä eri raja-arvoilla. Vaikka poissulkukriteerinä oli gluteeniton ruokavalio niin jo gluteenin rajoittaminen saattaa rajoittaa kaikkien todellisten keliaakikkojen löytämistä, mutta tämän vaikutuksen on arveltu olevan pieni (41). Tutkimustuloksia ei voi suoraan yleistää koko väestöön, koska tässä tutkimuksessa käsiteltiin pääosin keliaakikkojen sukulaisia.

Uudet ESPGHAN -kriteerit toimivat hyvin tässä aineistossa ja voimakkaasti positiiviset RBC-TG2ab-arvot ennustivat hyvin keliakiadiagnoosia. Joillakin potilailla biopsia ei tukenut diagnoosia, mutta muut serologiset testit tukivat diagnoosia voimakkaasti, joten on vaikea pitää näitä todellisina väärinä positiivisina. Lisäksi tulokset viittasivat siihen, että ESPGHAN-kriteereitä voidaan soveltaa myös aikuisväestössä. Kliinisen käyttökelpoisuuden varmistaminen vaatii vielä lisätutkimuksia.

Lähteet

1. Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:1–19.
2. Lohi S, Mustalahti K, Kaukinen K, et al. Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:1217–25.
3. Fasano A, Bertil I, Gerarduzzi T, et al. Prevalence of celiac disease in at risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med* 2003;163:286–92.
4. Myléus A, Hernell O, Gothefors L, et al. Early infections are associated with increased risk for celiac disease: an incident case-referent study. *BMC Pediatr*. 2012;12:194.
5. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001;120:636-51.
6. Wolters VM, Wijmenga C. Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 190–95.
7. Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder . *Nat Rev Immunol*. 2002;2: 647– 55.
8. Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. *Lancet* 2009;373:1480-93
9. Kaukinen K, Lindfors K, Collin P, et al. Coeliac disease--a diagnostic and therapeutic challenge. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1205-16.
10. Collin P, Reunala T. Recognition and management of the cutaneous manifestations of celiac disease: a guide for dermatologists. *Am J Clin Dermatol* 2003;4:13–20.
11. Bushara KO. Neurologic presentation of celiac disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 92–97.
12. Arigo D, Anskis AM, Smyth JM. Psychiatric comorbidities in women with Celiac Disease. *Chronic Illn* 2011;8:45-55.
13. Collin P, Huhtala H, Virta L et al. Diagnosis of celiac disease in clinical practice: physician's alertness to the condition essential. *J Clin Gastroenterol*. 2007 Feb;41(2):152-6.
14. Collin P, Kaukinen K, Vogelsang H, et al. Antiendomysial and antihuman recombinant tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis of coeliac disease: a biopsy proven European multicentre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:85-91

15. Hill ID. What are the sensitivity and specificity of serologic tests for celiac disease? Do sensitivity and specificity vary in different populations? *Gastroenterology* 2005; 128: 25–32.
16. Rostom A, Dube C, Cranney A, et al. The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology* 2005;128:S38–46.
17. Cataldo F, Lio D, Marino V, et al. IgG(1) antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac patients with selective IgA deficiency. *Gut* 2000; 47: 366–69.
18. Murray JA, Herlein J, Mitros F, et al. Serologic testing for celiac disease in the United States: results of a multilaboratory comparison study. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:584–7.
19. Kaukinen K, Lindfors K, Collin P et al. Coeliac disease - a diagnostic and therapeutic challenge. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1205-16.
20. Rashtak S, Murray JA. Tailored testing for celiac disease. *Ann Intern Med* 2007; 147: 339–41.
21. Donaldson M, Book L, Leiferman K, et al. Strongly positive tissue transglutaminase antibodies are associated with Marsh 3 histopathology in adult and pediatric celiac disease. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:256–60.
22. Barker C, Mitton G, Jevon G, et al. Can tissue transglutaminase antibody titers replace small-bowel biopsy to diagnose celiac disease in select pediatric population? *Pediatrics* 2005;115:1341–6.
23. Hill PG, Holmes GKT. Coeliac disease: a biopsy is not always necessary for diagnosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:572–7.
24. Ribes-Koninckx C, Mearin M, Korponay-Szabo I, et al. Coeliac disease diagnosis: ESPGHAN 1990 criteria or need for a change? Results of a questionnaire. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:15–9.
25. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:125–35.
26. Wong RC, Wilson RJ, Steele RH, et al. A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits. *J Clin Pathol* 2002;55:488–94.
27. Naiyer AJ, Hernandez L, Ciaccio EJ, et al. Comparison of commercially available serologic kits for the detection of celiac disease. *J Clin Gastroenterol* 2009;43:225–32.
28. Freeman HJ. Strongly positive tissue transglutaminase antibody assays without celiac disease. *Can J Gastroenterol* 2004;18:25–8.
29. Kempainen T, Janatuinen E, Holm K, et al. No observed local immunological response aT cell level after five years of oats in adult coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 2007;42:54–59.
30. Lundin KE, Nilssen EM, Scott HG, et al. Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut* 2003; 52: 1649–52.

31. Kempainen T, Kröger H, Janatuinen E, et al. Osteoporosis in adult patients with celiac disease. *Bone* 1999;24:249-55.
32. Viljamaa M, Kaukinen K, Pukkala E, et al. Malignancies and mortality in patients with coeliac disease and dermatitis herpetiformis: 30-year population-based study. *Dig Liver Dis* 2006;38:374–80.
33. Green PHR, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med* 2007;357:1731-43.
34. Caruso R, Pallone F, Stasi E, et al. Appropriate nutrient supplementation in celiac disease. *Ann Med*. 2013 Dec;45(8):522-3.
35. Whitaker JKH, West J, Holmes GKT, et al. Patient perceptions of the burden of coeliac disease and its treatment in the UK. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;29:1131-6.
36. Ukkola A, Mäki M, Kurppa K, et al. Patients' experiences and perceptions of living with coeliac disease: implications for optimizing care. *J Gastrointest Liver Dis*. 2012;21(1):17-22.
37. Mäki M, Holm K, Lipsanen V, et al. Serological markers and HLA genes among healthy first-degree relatives of patients with coeliac disease. *Lancet* 1991;338:1350-3.
38. Dickey W, Hughes DF, et al. Patients with serum IgA endomysial antibodies and intact duodenal villi: clinical characteristics and management options. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:1240-3.
39. Kurppa K, Collin P, Viljamaa M, et al. Diagnosing mild enteropathy celiac disease: a randomized, controlled clinical study. *Gastroenterology* 2009;136:816-213.
40. Kurppa K, Ashorn M, Iltanen S, et al. Celiac disease without villous atrophy in children: a prospective study. *J Pediatr* 2010;157:373–80.
41. van Overbeek FM, Uil-Dieterman IG, Mol IW, et al. The daily gluten intake in relatives of patients with coeliac disease compared with that of the general Dutch population. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:1097–9.

Utility of the New ESPGHAN Criteria for the Diagnosis of Celiac Disease in At-risk Groups

Kalle Kurppa, Jaakko Salminiemi, Anniina Ukkola, Päivi Saavalainen, Katja Löytynoja, Kaija Laurila, Pekka Collin, Markku Mäki and Katri Kaukinen

ABSTRACT

Objective: Demonstration of small-bowel mucosal damage has been the basis of celiac disease diagnosis, but the diagnostic approach is undergoing changes. The European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition recently stated that in a subgroup of children, high positive transglutaminase 2 antibody (TG2ab) values may be sufficient for the diagnosis. The utility of these new criteria was evaluated by applying the human red blood cell TG2 antibody test (RBC-TG2ab) to a large cohort of children and adults belonging to at-risk groups.

Methods: RBC-TG2ab and endomysial antibodies (EmA) were measured in 3031 family members or other relatives of patients with celiac disease. The RBC-TG2ab values were classified as weak (20–29 U), moderate (30–99U), and strong (≥ 100 U) positive. Seropositive subjects were further tested by human recombinant TG2ab (Hr-TG2ab) and for the presence of celiac disease–associated human leukocyte antigen-DQ alleles. Gastroscopy was recommended for all with positive RBC-TG2ab, EmA, or Hr-TG2ab, or weak positive RBC-TG2ab and symptoms.

Results: Strong positive RBC-TG2ab has good correlation with EmA and Hr-TG2ab and positivity of DQ2/8, and the diagnosis was established in 94% of both children and adults. In contrast, moderately positive (≥ 30 U) RBC-TG2ab showed poor correlation with the other tests, and celiac disease was diagnosed in 69% of children and 86% of adults. Most participants with weak positive RBC-TG2ab were negative for EmA and Hr-TG2ab.

Conclusions: In accordance with the new European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition criteria, strong positive RBC-TG2ab showed good accuracy and excellent correlation with the other antibodies and celiac-type human leukocyte antigen. In contrast, low or moderately positive RBC-TG2ab values were of unsatisfactory prognostic value for a subsequent diagnosis.

Key Words: celiac disease, criteria, diagnosis, European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (J Pediatr Gastroenterol Nutr 2012;54:387–91)

For the past few decades, the classical picture of celiac disease as a childhood diarrheal disease has been replaced by the conception of an autoimmune-mediated disorder with a strong genetic predisposition. It has become evident that the disease may appear at any age and with heterogeneous clinical presentation (1). Contemporaneously, the prevalence has increased up to 1% to 2% (2,3), and diagnostic facilities have improved (4,5). Until now, the demonstration of small-bowel mucosal damage has been the basis for diagnosis (1,6), but because of the aforementioned changes and obvious problems in the interpretation of the histology, particularly in borderline cases, this standard approach has been questioned (7–10). Recently, new diagnostic criteria were published by the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN) (11). It was stated that in a subgroup of children with high serum transglutaminase 2 antibody (TG2ab) values, celiac disease could be established without histological confirmation. It was evident that the feasibility of such an essential change should be tested in different study designs. One of the problems is that there are different TG2ab tests, and studies referring to the new ESPGHAN criteria have been performed mainly in tertiary centers in subjects with classical gastrointestinal disease (11). It is also important to know whether the new criteria are applicable to adults.

The human red blood cell TG2 antibody test (RBC-TG2ab) is approved by the US Food and Drug Administration as a serological assay for celiac disease. We investigated the validity of the new ESPGHAN criteria (11) by applying RBC-TG2ab in a large at-risk cohort of apparently asymptomatic children and adults. The results were compared with 2 other frequently applied serological tests and with the presence of celiac disease–associated human leukocyte antigen (HLA) DQ2 and DQ8 alleles.

METHODS

Study Design

The study was carried out at the Department of Gastroenterology and Alimentary Tract Surgery, Tampere University Hospital, and at the Pediatric Research Center, Tampere University Hospital and University of Tampere, Tampere, Finland. The study cohort was collected by recruiting first a total of 730 previously diagnosed patients with celiac disease (index cases) in a nationwide search using leaflets and via celiac disease societies (Fig. 1). All of the diagnoses were confirmed from the hospital patient records. Next, the family members and first- or second-degree relatives of the index patients were invited to undergo an evaluation of serum celiac antibodies and celiac disease-related genetics. The utility of the new ESPGHAN criteria was evaluated by dividing the participants into different subgroups on the basis of their baseline RBC-TG2ab values and offering the possibility of further endoscopic studies, as specified below. Subjects who had a previous celiac disease or dermatitis herpetiformis diagnosis, or were receiving a gluten-free diet for another reason, were excluded (Fig. 1).

The study procedure was approved by the ethical committee of Tampere University Hospital. All of the study participants, or in the case of children, their parents, gave written informed consent.

Serological Tests

Serum immunoglobulin A (IgA) class RBC-TG2ab values were measured in all of the study participants according to the manufacturers' instructions (Quanta Lite h-tTG IgA enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA] kit; INOVA diagnostics, San Diego, CA). The specific cutoff limits recommended by the manufacturer were values <20U negative, 20 to 29U weak positive, and all of the values ≥ 30 U from moderate to strong positive. In the present study, values ≥ 100 U, that is 5 times the upper limit of normal (ULN), were considered strong positive (11). Serum immunoglobulin A-class endomysium antibodies (EmA) were determined by an indirect immunofluorescence method using human umbilical cord as substrate, and a dilution 1: ≥ 5 was considered positive (12). The positive samples were further diluted 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000, and 1:4000. All of the serum samples positive for either RBC-TG2ab or EmA were further tested using the human recombinant TG2 antibody test (Hr-TG2ab) according to the

manufacturer's instructions (Celikey ELISA kit; Phadia GmbH, Freiburg, Germany). Serum Hr-TG2ab values of ≥ 3.0 U were considered positive (9,11).

Upper Gastrointestinal Endoscopy and Small-bowel Mucosal Biopsies

An upper gastrointestinal endoscopy with small-bowel mucosal biopsies was offered to all of the participants with moderate to strong positive RBC-TG2ab, positive EmA, or positive Hr-TG2ab. In the case of weak positive human RBC-TG2ab, further investigations were recommended only upon the request of the patient or if there were signs of celiac disease–associated clinical symptoms or complications. The endoscopies and histological evaluation of the mucosal specimens were carried out at local health care units according to our standard procedures (13). The diagnosis of celiac disease was based on the demonstration of small-bowel mucosal villous atrophy and crypt hyperplasia (Marsh III) (6).

Genotyping

The presence of celiac disease–associated HLA-DQ2 and -DQ8 alleles was genotyped from the RBC-TG2ab- and EmA-positive subjects with the tagging single-nucleotide polymorphism method detecting the DQ2.5, DQ2.2, DQ7, and DQ8 haplotypes (14,15) or with the Olerup SSP DQ low-resolution kit detecting the DQB1*02 (DQ2, either DQ2.5 or DQ2.2), DQB1*0302 (DQ8,) and DQB1*0301 (DQ7) among the other DQB1 main allele groups (Olerup SSP AB, Stockholm, Sweden).

Statistical Analysis

Statistical data were presented as number of subjects and percentages or as median and ranges.

RESULTS

A total of 3031 nonceliac subjects were eligible and participated in the serological testing (Fig. 1). In total, 25% of the participants were younger than 18 years. The subjects' characteristics are shown in Table 1. The majority were first-degree relatives, particularly siblings and parents, who also had the highest percentage of new celiac disease diagnoses. In contrast, the percentage was significantly lower in second-degree relatives. None of the nonrelative spouses were found to have celiac disease. There was an excellent relation between the strong positive (≥ 5 times ULN) RBC-TG2ab values and positivity for EmA and Hr-TG2ab (Table 2). In addition, the celiac disease-associated HLA-DQ2, -DQ8, or half DQ2 was found in all of those in whom it was evaluated (Table 3). In total, 91% of those with strong positive RBC-TG2ab underwent gastroscopy and celiac disease was diagnosed in 94% of children and 94% of adults (Table 2). In contrast, the association between moderately positive (30–99 U) RBC-TG2ab values and positivity for EmA and Hr-TG2ab was poor (Table 2). A substantial proportion of such cases did not have celiac-type HLA (Table 3). Celiac disease was detected in 35% of children, 74% of adults, and, in total, 64% of those who had RBC-TG2ab 30 to 99U and were biopsied. By applying an overall cutoff value ≥ 30 U, the corresponding figures were 69%, 86%, and 82%, respectively (Table 2). The majority of participants with weak positive (20–29 U) RBC-TG2ab were negative for EmA and Hr-TG2ab (Table 2), and up to 16% also lacked the HLA-DQ2- or -DQ8-encoding alleles (Table 3). Only 4 adults and 1 child with weak positive RBC-TG2ab underwent gastroscopy because of significant clinical symptoms, and celiac disease was confirmed in 4 of them.

There was 1 RBC-TG2ab-positive EmA-negative patient and 1 RBC-TG2ab-negative (value 19 U) EmA-positive patient who were found to have celiac disease. Conversely, 11% of those (3 children and 10 adults) with a new diagnosis were false-negative for Hr-TG2ab (median value 1.8 U, range 0.0–2.8 U) and would have been missed by applying this test only.

DISCUSSION

Apart from improvements in serological methods, several problems were found in the present histology-based criteria for celiac disease, which further emphasize the need for their revision. Endoscopies are expensive and burdensome, particularly in children in whom general anesthesia is usually required. The mucosal lesion can be patchy, and inaccurate slicing and an inappropriate orientation of the biopsy samples are much more common than is generally assumed (16). In addition, the interpretation of biopsy results is subjective, and even if correctly identified, small-bowel mucosal villous atrophy is not pathognomonic for celiac disease (1). The new diagnostic algorithm issued by ESPGHAN is based primarily on TG2ab, in view of its known accuracy and amenability to measurement by practical ELISA. The specificity of the quantitative method is thought to increase in parallel with the serum values, and depending on the test, TG2ab values 2.4 to 13.6 times ULN were offered in the new criteria as a cutoff value that could replace gastroscopy (11).

In the present study, we used the recommended 5 times ULN for RBC-TG2ab to challenge the ESPGHAN criteria. The results were for the most part in accord with these criteria because strong positive RBC-TG2ab values showed good accuracy for subsequent celiac disease in both children and adults. It was also shown that the criteria are applicable to a wide range of celiac patients, including apparently asymptomatic subjects detected by screening in at-risk groups. The positive predictive value was not 100%, but there was an extremely high correlation between the ≥ 5 times ULN RBCTG2ab, and the presence of positive EmA, Hr-TG2ab, and celiac disease-associated HLA alleles in these individuals, which makes a false-positive result unlikely. We again emphasize that the positive predictive value of a biopsy is far less than 100%, not only because of difficulties in the interpretation of samples; the development of the small-bowel mucosal damage is a gradual process, and we and others have shown that positivity for EmA is a strong predictor of subsequent celiac disease even in subjects with normal villi (17–20). There is also evidence that these patients benefit from early dietary treatment even before the villous atrophy develops (19,20). The cost–benefit of a gluten-free diet in such cases is a subject for further study, but it must be realized that if the diagnosis is not obtained, symptomatic seropositive individuals must undergo repeated endoscopies until the mucosal damage develops. One can assume that the prevalence of early histological damage is increased in screen-detected populations such as that in our study group (21).

In an earlier study, Wong et al (22) observed 100% specificity for equal RBC-TG2ab test by applying a cutoff value 5 times ULN in adults. In addition, a small number of other studies have evaluated corresponding but guinea pig- or Hr-TG2ab-based TG2-ab tests. Donaldson et al (7) investigated 28 children and 48 adults and identified celiac disease in 96% (93% and 98%, respectively) of those with TG2ab \geq 5 times ULN. In a study by Barker et al (8), 48 of 49 children received a diagnosis when an equivalent cutoff value for TG2ab was applied. In contrast, Freeman (23) observed normal villi in 3 of 14 subjects with TG2ab \geq 5 times ULN and concluded that the small-bowel biopsy is still mandatory. These discrepancies suggest that variables such as age of patient, histological methods used, and pretest probability in the population in question may affect results. Nonetheless, it appears that a combination of strong positive TG2ab values and celiac disease-associated HLA alleles implies an extremely low risk of false-positive diagnosis. Further prospective studies are required to establish whether the new criteria are equally valid in countries and populations in which the disease prevalence and pretest probability are different.

In contrast to the strong positive RBC-TG2ab values, moderate or low positive values had rather poor specificity for the subsequent small-bowel mucosal villous atrophy and celiac disease diagnosis. Moreover, the low correlation with the other serological tests and the absence of celiac-type HLA alleles in several subjects suggest that they were truly false-positive. Previously, Barker et al (8) obtained similar results, because in their study celiac disease was confirmed in only 44% of the children with moderately positive TG2ab values. Conversely, Naiyer et al (24) achieved 95% specificity for RBC-TG2ab by applying a cutoff value \geq 20U in adults. Once again, these differences show that selection of the study population is of particular importance. In any case, it is evident that a more comprehensive diagnostic procedure, including histological examinations, is required before a final celiac disease diagnosis can be established in individuals with low positive RBC-TG2ab.

There were certain limitations to the present study. First, the endoscopies were not carried out in a single center or in all of the seropositive participants; however, the diagnostic procedure is well standardized in Finland (13), and the primary aim was to evaluate subjects with strong positive RBC-TG2ab values, of whom 94% underwent biopsy. Second, it was impossible to perform endoscopy in all of the participants and thus measure the overall sensitivities of the serological tests. A further limitation was that, even though it was an exclusion criterion, inadvertently reduced dietary gluten in relatives may have underestimated the true prevalence of celiac disease. Nevertheless, any significant effect on the overall results would appear to be minimal (25). Finally, our study group comprised primarily relatives of patients, and the results cannot be directly

generalized to other groups at risk for celiac disease. Our results were compatible with the new ESPGHAN criteria and showed that high positive RBC-TG2ab values had good predictive value for subsequent celiac disease. Some patients yielded negative biopsy results, but the strong association with the other serological tests and celiac-type HLA alleles indicates that they were not true false-positives. In addition, the results indicated that the new ESPGHAN criteria could be extended to the adult population. In the future, prospective studies should be carried out to confirm the validity of the new criteria in clinical practice.

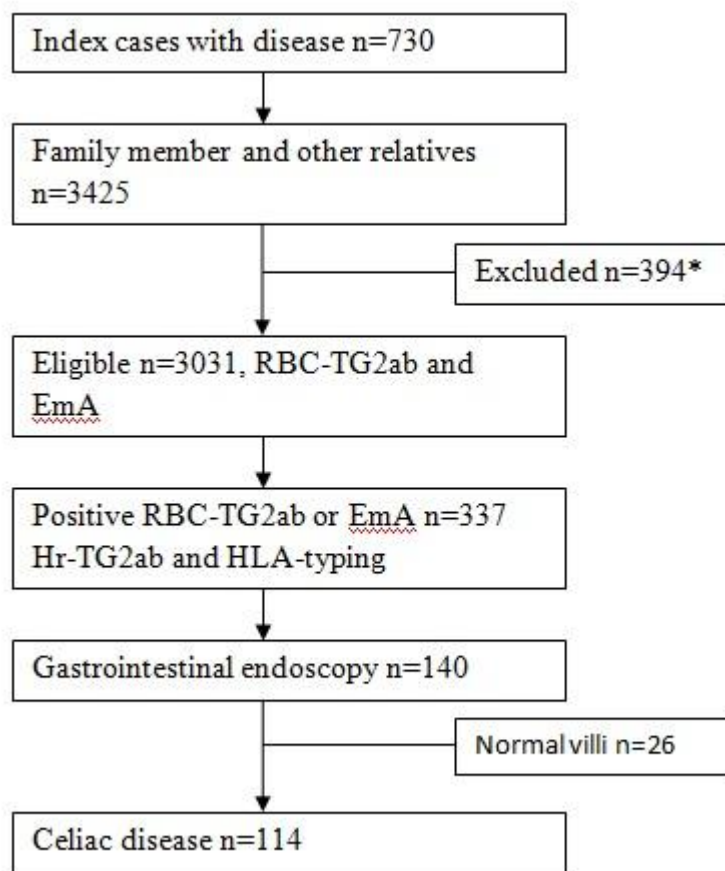


FIGURE 1. Flowchart of the study. EmA=serum endomysial antibodies; RBS-TG2ab=human red blood cell transglutaminase 2 antibodies; Hr-TG2ab= human recombinant transglutaminase 2 antibodies. *Previous celiac disease or dermatitis herpetiformis diagnosis, or a gluten-free diet for another reason.

TABLE 1. Demographic data on the study cohort and the number of subjects with a new celiac disease diagnosis, and their relation to the celiac disease index patient

	Cases		Female patients		Age, y		Celiac disease*	
	n	%	n	%	Median	Range	n	%
Parent	540	18	317	59	64	23-91	20	4
Sibling	862	28	479	56	48	1-87	50	6
Child	941	31	519	55	23	1-77	29	3
Other†	635	21	349	55	20	1-96	15	2
Spouse	53	2	21	40	63	30-80	0	0
Total	3031	100	1682	55	37	1-96	114	4

*Biopsy-proven new diagnosis

†Second-degree relatives

TABLE 2. Positivity of serum EmA and Hr-TG2ab and the number of new celiac disease diagnoses, divided according to human RBC-TG2ab values

RBC-TG2ab, U	n	Antibodies				n†	Endoscopy			
		EmA+		Hr-TG2+			Diagnosis		Normal*	
		n	%	n	%		n	%	n	%
≥100	88	87	99	87	99	80	75	94	5	6
≥30	212	141	67	131	62	133	109	82	24	18
≥20	336	146	43	133	40	138	113	82	25	18
<20	2695	1	0.04	ND	ND	1	1	100	0	0
Total	3031	147	5	ND	ND	139	114	82	25	18

EmA= serum endomysial antibodies; Hr-TG2= human recombinant transglutaminase 2; ND= no data; RBC-TG2ab= human red blood cell transglutaminase 2 antibody

*Celiac disease excluded by normal small-bowel mucosal villous morphology.

†Not all of the antibody-positive patients were endoscoped.

TABLE 3. Presence of celiac disease-associated HLA-type in Ema-, Hr-TG2ab- and RBCab-positive study participants*

Celiac-type HLA (%)	Ema+ 1: ≥ 5 n=140	Hr-TG2ab+ ≥ 3.0 U n=125	RBC-TG2+		
			20-29U n=116	30-99U n=116	≥ 100 n=85
Negative	0	0	16.2	6.9	0
DQ2.2 or DQ7	1.4	0.9	9.4	6.0	2.4
DQ2 or DQ8	98.6	99.1	74.4	87.1	97.6
Total celiac type HLA	100.0	100.0	83.8	93.1	100.0

EmA=endomysial antibody; HLA= human leukocyte antigen; Hr-TG2ab=human recombinant transglutaminase 2 antibody; RBC-TG2ab= red blood cell transglutaminase 2 antibody.

*Genetics samples of 20 subjects were not available

REFERENCES

1. Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:1–19.
2. Lohi S, Mustalahti K, Kaukinen K, et al. Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:1217–25.
3. Fasano A, Bertil I, Gerarduzzi T, et al. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med* 2003;163:286–92.
4. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997;3:797–801.
5. Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, et al. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 1998;115:1584–6.
6. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, et al. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of working group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch Dis Child* 1990;65:909–11.
7. Donaldson M, Book L, Leiferman K, et al. Strongly positive tissue transglutaminase antibodies are associated with Marsh 3 histopathology in adult and pediatric celiac disease. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:256–60.
8. Barker C, Mitton G, Jevon G, et al. Can tissue transglutaminase antibody titers replace small-bowel biopsy to diagnose celiac disease in select pediatric population? *Pediatrics* 2005;115:1341–6.
9. Hill PG, Holmes GKT. Coeliac disease: a biopsy is not always necessary for diagnosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:572–7.
10. Ribes-Koninckx C, Mearin M, Korponay-Szabo I, et al. Coeliac disease diagnosis: ESPGHAN 1990 criteria or need for a change? Results of a questionnaire. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:15–9.
11. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:125–35.
12. Ladinser B, Rossipal E, Pittschieler K. Endomysium antibodies in coeliac disease: an improved method. *Gut* 1994;35:776–7.
13. Virta LJ, Kaukinen K, Collin P. Incidence and prevalence of diagnosed coeliac disease in Finland: results of effective case finding in adults. *Scand J Gastroenterol* 2009;44:933–8.

14. Monsuur AJ, de Bakker PI, Zhernakova A, et al. Effective detection of human leukocyte antigen risk alleles in celiac disease using tag single nucleotide polymorphisms. *PLoS One* 2008;28:e2270.
15. Koskinen L, Romanos J, Kaukinen K, et al. Cost-effective HLA typing with tagging SNPs predicts celiac disease risk haplotypes in the Finnish, Hungarian, and Italian populations. *Immunogenetics* 2009; 61:247–56.
16. Collin P, Kaukinen K, Vogelsang H, et al. Antiendomysial and antihuman recombinant tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis of coeliac disease: a biopsy-proven European multicentre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:85–91.
17. Mäki M, Holm K, Lipsanen V, et al. Serological markers and HLA genes among healthy first-degree relatives of patients with coeliac disease. *Lancet* 1991;338:1350–3.
18. Dickey W, Hughes DF, et al. Patients with serum IgA endomysial antibodies and intact duodenal villi: clinical characteristics and management options. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:1240–3.
19. Kurppa K, Collin P, Viljamaa M, et al. Diagnosing mild enteropathy celiac disease: a randomized, controlled clinical study. *Gastroenterology* 2009;136:816–23.
20. Kurppa K, Ashorn M, Iltanen S, et al. Celiac disease without villous atrophy in children: a prospective study. *J Pediatr* 2010;157:373–80.
21. Hogen Esch CE, Csizmadia GD, van Hoogstraten IM, et al. Childhood coeliac disease: towards an improved serological mass screening strategy. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:760–6.
22. Wong RC, Wilson RJ, Steele RH, et al. A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits. *J Clin Pathol* 2002;55:488–94.
23. Freeman HJ. Strongly positive tissue transglutaminase antibody assays without celiac disease. *Can J Gastroenterol* 2004;18:25–8.
24. Naiyer AJ, Hernandez L, Ciaccio EJ, et al. Comparison of commercially available serologic kits for the detection of celiac disease. *J Clin Gastroenterol* 2009;43:225–32.
25. van Overbeek FM, Uil-Dieterman IG, Mol IW, et al. The daily gluten intake in relatives of patients with coeliac disease compared with that of the general Dutch population. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9:1097–9.